



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

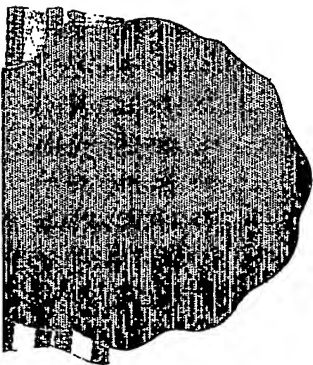
REC'D 06 SEP 2004

WIPO PCT

## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200302020, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 22 de Agosto de 2003.

Madrid, 30 de Julio de 2004



El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

P.D.

MIGUEL HIDALGO LLAMAS

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200302020

03 AEO 22 12 20

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

Madrid

CÓDIGO

28

NACIONALIDAD  
ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS  
ES

DNICIF  
G82198524

CNAE  
73

PYME

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA  
APLICADA (FIMA)

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNICIF

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO Plaza de Pintor Paret 5-1ºF

LOCALIDAD Pamplona

PROVINCIA Navarra

PAÍS RESIDENCIA España

NACIONALIDAD Española

TELÉFONO 948 425600 (2028)

FAX 948 425715

CORREO ELECTRÓNICO ferrasti@unav.es

CÓDIGO POSTAL 31008

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

DOTOR DE LAS HERRERIAS

LOPEZ VAZQUEZ

LASARTE SAGASTIBELZA

Javier

Ana Belén

Juan José

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

PEPTIDOS CON CAPACIDAD DE UNIRSE AL FACTOR TRANSFORMANTE DE CRECIMIENTO BETA 1 (TGF-b1)

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO  
PAÍS

NÚMERO

FECHA

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE / REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 22

☒ Nº DE REVINDICACIONES: 18

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 5

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 8

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☐ OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1988.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 310/1 - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

9200732020

FECHA DE PRESENTACIÓN

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O  
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO  
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

PRIETO VALTUEÑA  
BORRÁS CUESTA

Jesús  
Francisco

Española  
Española

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO  
PAÍS

NÚMERO

FECHA



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200302020

FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

### PEPTIDOS CON CAPACIDAD PARA UNIRSE AL FACTOR TRANSFORMANTE DEL CRECIMIENTO beta 1

Los péptidos tienen la capacidad de unirse al Factor Transformante de crecimiento beta 1 (TGF-b1) y son potenciales inhibidores de la actividad biológica del TGF-b1 mediante su unión directa a dicha citoquina. Estos péptidos pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas basadas en una expresión excesiva o desregulada del TGF-b1.

GRÁFICO



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes

12

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21	NÚMERO DE SOLICITUD
P 200302020	
22	FECHA DE PRESENTACIÓN
62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA

31	NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD	32	FECHA	33	PAÍS
71 SOLICITANTE (S) <b>FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA APLICADA</b> DOMICILIO <b>Plaza de Pintor Paret 5-1º F. ( 31008) Pamplona</b> NACIONALIDAD <b>ESPAÑOLA</b>						
72 INVENTOR (ES) <b>DOTOR DE LAS HERRERIAS Javier LOPEZ VAZQUEZ Ana Belén LASARTE SAGASTIBELZA Juan José PRIETO VALTUEÑA Jesús BORRAS CUESTA Francisco</b>						
51 Int. Cl.			GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)			
54 TÍTULO DE LA INVENCION <b>PEPTIDOS CON CAPACIDAD PARA UNIRSE AL FACTOR TRANSFORMANTE DEL CRECIMIENTO beta 1</b>						
57 RESUMEN <b>PEPTIDOS CON CAPACIDAD PARA UNIRSE AL FACTOR TRANSFORMANTE DEL CRECIMIENTO beta 1</b> <b>Los péptidos tienen la capacidad de unirse al Factor Transformante de crecimiento beta 1 (TGF-b1) y son potenciales inhibidores de la actividad biológica del TGF-b1 mediante su unión directa a dicha citoquina. Estos péptidos pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas basadas en una expresión excesiva o desregulada del TGF-b1.</b>						

## **PÉPTIDOS CON CAPACIDAD PARA UNIRSE AL FACTOR TRANSFORMANTE DEL CRECIMIENTO $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

5 La invención se refiere, en general, a péptidos que tienen la capacidad de unirse al factor transformante de crecimiento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) y a sus aplicaciones. En particular, la invención se refiere a péptidos inhibidores de la actividad biológica del TGF- $\beta 1$  mediante su unión directa al TGF- $\beta 1$ , y a su empleo en el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas basadas en una expresión excesiva o  
10 desregulada del TGF- $\beta 1$ .

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El TGF- $\beta 1$  es una glicoproteína perteneciente a una superfamilia de proteínas reguladoras (citoquinas) estructuralmente relacionadas entre sí, incluida dentro de una  
15 de las tres isoformas descritas en mamíferos (TGF-beta 1, 2 y 3). La isoforma más abundante es TGF- $\beta 1$ , que consiste en un homodímero de 25 kDa compuesto por 2 subunidades unidas por un puente disulfuro. La secuencia de aminoácidos del TGF- $\beta 1$  humano ha sido descrita por, por ejemplo, Derynck K et al., "Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal\* and  
20 transformed cells". Nature 316 (6030), 701-705 (1985).

El TGF- $\beta 1$  es una molécula cuya secuencia está altamente conservada en términos evolutivos. Aunque originalmente se definió por su capacidad para inducir proliferación independiente de adhesión y cambios morfológicos en fibroblastos de rata, investigaciones posteriores han revelado que el TGF- $\beta 1$  es un inhibidor general de la  
25 proliferación en un gran número de tipos celulares. Es producido por una gran variedad de tipos celulares y en diferentes tejidos durante todas las fases de la diferenciación celular. Produce una gran variedad de efectos biológicos, genera potentes y muy a menudo opuestos efectos en el desarrollo, fisiología y respuesta inmune. Información sobre el papel del TGF- $\beta 1$  en la diferenciación y regeneración hepática, y en la fibrosis  
30 hepática, así como los efectos del TGF- $\beta 1$  sobre la matriz extracelular, puede encontrarse en la solicitud de patente española ES 2146552 A1.

Teniendo como objetivo el estudio de los mecanismos de acción del TGF- $\beta 1$ , se

han descrito una decena de proteínas (receptores de membrana y proteínas de matriz extracelular) que interaccionan con esta citoquina.

Por otra parte, debido a que numerosas enfermedades o alteraciones patológicas están asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1, por ejemplo, las fibrosis asociadas con la pérdida de función de un órgano o tejido, o complicaciones quirúrgicas o estéticas, resulta interesante buscar productos capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1, dado que tales productos podrían ser potencialmente utilizados en terapia humana o animal como bloqueantes de las consecuencias patológicas de una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1.

Las estrategias habitualmente utilizadas para inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 incluyen, entre otras, el empleo de (i) anticuerpos específicos neutralizantes, (ii) oligos antisentido del gen codificante del TGF- $\beta$ 1 que bloquean su expresión, o (iii) receptores solubles del TGF- $\beta$ 1 que actúan de forma similar a los anticuerpos. El empleo de anticuerpos permite un bloqueo total y específico de esta citoquina (TGF- $\beta$ 1) aunque se potencian ciertos efectos secundarios tanto por la presencia de inmunoglobulinas exógenas en sangre como por los efectos derivados del bloqueo sistémico del TGF- $\beta$ 1. Además, la estabilidad en el tiempo de las inmunoglobulinas no permite un control a tiempos cortos del bloqueo en la actividad de esta citoquina. Los oligos antisentido inhiben la producción del TGF- $\beta$ 1 a nivel de expresión génica, lo que puede generar desregulaciones importantes en todos los procesos en los que interviene esta citoquina.

Recientemente se ha desarrollado otra estrategia basada en el empleo de péptidos inhibidores de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1. En este sentido, la solicitud de patente española ES 2146552 A1 describe unos péptidos sintéticos procedentes tanto del TGF- $\beta$ 1 como de sus receptores, o de proteínas con capacidad de unión al TGF- $\beta$ 1, que pueden ser utilizados como inhibidores de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra esquemáticamente la posición de un péptido de 15 aminoácidos (aa), genéticamente fusionado a la proteína pIII, en la superficie del bacteriófago filamentoso M13.

La Figura 2 muestra esquemáticamente la posición génica del inserto, que codifica para un péptido de 15 aa, en el genoma del bacteriófago M13 y la posición del péptido en la secuencia de la proteína pIII.

La Figura 3 muestra esquemáticamente la selección de péptidos mediante la técnica de "Biopanning". El TGF- $\beta$ 1 biotinilado se inmoviliza en placas que contienen estreptavidina (a través de la unión biotina-estreptavidina). La librería de fagos es seleccionada sobre la base de la interacción entre el TGF- $\beta$ 1 y los péptidos presentados por los fagos. Los fagos con baja afinidad por el TGF- $\beta$ 1 son eliminados mediante lavados. Los fagos retenidos en la placa son eluidos mediante descenso de pH. Tras tres ciclos de enriquecimiento de fagos con alta afinidad por el TGF- $\beta$ 1, los fagos se aíslan y secuencian (véase el Ejemplo 1) [Leyendas de la Figura 3: "a": Librería de fagos presentando péptidos de 15 aa; "b": Infección en *E. coli* (K91Kan)(amplificación); "c": Purificación de los fagos; "d": Incubación de los fagos con concentraciones decrecientes de TGF- $\beta$ 1; "e": Lavados; "f": Elución de los fagos unidos ( $\downarrow$ pH); "g": Infección en cepa de *E. coli*; "h": Selección de colonias infectadas (tetraciclina); "i": Amplificación de los fagos seleccionados; y "j": Secuenciación del ADN (correspondiente al péptido) al cabo de tres ciclos de "biopanning"].

La Figura 4 es una representación de un árbol de analogías de secuencia entre los péptidos de 15 aminoácidos identificados mediante una librería de fagos.

La Figura 5 es un diagrama que muestra el efecto de la concentración de TGF- $\beta$ 1 sobre el crecimiento de la línea celular Mv-1-Lu, expresada en forma de captación de timidina tritiada en cuentas por minuto (c.p.m.).

La Figura 6 es un diagrama ilustrativo del protocolo de inducción de daño hepático agudo (véase el Ejemplo 3).

## COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta, en general, con el problema de buscar nuevos compuestos capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

La solución proporcionada por la presente invención se basa en que los inventores han identificado unos péptidos capaces no solo de unirse al TGF- $\beta$ 1 sino, además, capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 mediante su unión directa al propio TGF- $\beta$ 1. Estos péptidos han sido identificados mediante el empleo de la



tecnología asociada con las librerías de fagos que permite determinar péptidos, con un tamaño típicamente comprendido entre 6 y 15 aminoácidos, que presentan una unión de alta afinidad con el TGF- $\beta$ 1, cuantificando, posteriormente, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, la capacidad de inhibición de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 de los distintos péptidos.

Los péptidos capaces de unirse al TGF- $\beta$ 1, en particular, aquéllos capaces de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 mediante su unión directa al TGF- $\beta$ 1 son potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1. Asimismo, los péptidos capaces de unirse al TGF- $\beta$ 1 proporcionan una herramienta para el estudio del papel biológico del TGF- $\beta$ 1 (aún por dilucidar en muchos campos de la regulación de distintos procesos biológicos).

Por tanto, un aspecto de esta invención se relaciona con unos péptidos que poseen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1. En una realización particular y preferida, dichos péptidos tienen, además, la capacidad de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende, al menos, uno de dichos péptidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichos péptidos en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1. Ejemplos ilustrativos de dichas enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 incluyen la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido así como complicaciones quirúrgicas y/o estéticas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con secuencias de ADN que codifican para dichos péptidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica para un péptido proporcionado por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicha secuencia de ADN o dicha construcción de ADN.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora transformada, que comprende dicha construcción de ADN o dicho vector.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir  
5 un péptido proporcionado por esta invención que comprende cultivar dichas células hospedadoras bajo condiciones que permiten la expresión de dicho péptido y, si se desea, recuperar el péptido obtenido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas secuencias de ADN y construcciones de ADN en la elaboración de vectores y células para el  
10 tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se relaciona con un péptido, en adelante, péptido de  
15 la invención, cuya secuencia de aminoácidos comprende entre 3 y 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,  
20 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1. Algunos de dichos péptidos tienen, además, la capacidad de inhibir, *in vitro* y/o *in vivo*, la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1.

25 La capacidad de los péptidos de la invención de unirse al TGF- $\beta$ 1 se puede determinar mediante cualquier método apropiado que permita determinar la unión entre dos moléculas, por ejemplo, mediante un ensayo de afinidad, que comprende poner en contacto el TGF- $\beta$ 1 con el péptido a ensayar bajo condiciones que permiten la unión de dicho péptido al TGF- $\beta$ 1 y evaluar la unión entre el péptido y el TGF- $\beta$ 1. En una  
30 realización particular, dicho ensayo de afinidad puede realizarse utilizando TGF- $\beta$ 1 marcado radiactivamente, por ejemplo,  $^{125}$ I-TGF- $\beta$ 1 humano, tal como se describe en ES 2146552 A1. Alternativamente, el compuesto que puede estar marcado es el péptido

a ensayar. En general, este tipo de ensayos de afinidad comprende poner en contacto TGF- $\beta$ 1, por ejemplo, inmovilizado en una placa bloqueada con estreptavidina, con el péptido cuya capacidad de unión al TGF- $\beta$ 1 se desea conocer, y, tras incubar durante un periodo de tiempo apropiado, analizar la unión del péptido al TGF- $\beta$ 1. Los péptidos con  
5 baja afinidad por el TGF- $\beta$ 1 son eliminados mediante lavados mientras que los péptidos con mayor afinidad permanecen unidos al TGF- $\beta$ 1 y pueden ser liberados rompiendo las interacciones moleculares entre ambas moléculas, lo que puede realizarse, por ejemplo, bajando el pH. Ensayando el péptido frente a distintas concentraciones de TGF- $\beta$ 1, o viceversa, se puede obtener una idea de la afinidad del péptido en cuestión  
10 frente al TGF- $\beta$ 1. La capacidad de los péptidos de la invención de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 *in vitro* se puede evaluar y, si se desea, cuantificar, mediante un ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular Mv-1-Lu, una línea celular derivada de epitelio pulmonar de visón cuya proliferación es inhibida por el TGF- $\beta$ 1 (véase el Ejemplo 2).

15 La capacidad de los péptidos de la invención de inhibir la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 *in vivo* se puede evaluar y, si se desea, cuantificar mediante un ensayo en un modelo animal de daño hepático agudo inducido, por ejemplo, por administración de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (véase el Ejemplo 3). Como es conocido, el daño hepático agudo genera una cascada de efectos y respuestas fisiológicas que incluye la  
20 elevación de los niveles del TGF- $\beta$ 1, responsable, entre otros efectos, de la expresión del gen de colágeno de tipo I, entre otros.

Dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención. El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye las sales habitualmente utilizadas para formar sales metálicas o sales de adición  
25 de ácidos. La naturaleza de la sal no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención pueden obtenerse a partir de ácidos o bases, orgánicos o inorgánicos. Dichas sales pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia.

En una realización particular, la invención proporciona un péptido que  
30 comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización concreta, la invención proporciona un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización concreta, la invención proporciona un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, 15 SEQ ID NO: 18, y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 17, presentan actividad inhibidora de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1, tanto *in vitro* como *in vivo*; el péptido identificado por la SEQ ID NO: 2 presenta únicamente actividad inhibidora de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 *in vivo*; y los péptidos 20 identificados por la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 18, presentan únicamente actividad inhibidora de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 *in vitro*.

Para la identificación inicial de péptidos con capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1 se ha utilizado la tecnología asociada con las librerías de fagos que permite determinar péptidos que presentan una unión de alta afinidad con el TGF- $\beta$ 1, y cuantificar, 25 posteriormente, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, la capacidad de inhibición de la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1 de los distintos péptidos. La secuencia de los péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1, inhibiendo *in vitro* o *in vivo* la actividad biológica del TGF- $\beta$ 1, se puede deducir a partir de la secuencia del ADN correspondiente al cabo de varios ciclos de "biopanning", generalmente 3. El empleo de librerías de fagos para identificar 30 inhibidores de ciertos productos ha sido descrita, por ejemplo, por Chirinos-Rojas C.L. et al., en Immunology, 1999, Jan. 96(1):109-113; McConnell S.J., et al., en Gene 1994,

Dec. 30, 151(1-2):115-118; o Smith G.P., Science, 1985, Jun. 14, 228(4705):1315-1317.

Por tanto, la invención proporciona un método para la identificación de péptidos que tienen la capacidad de unirse al TGF- $\beta$ 1 que comprende:

- 5           (i)           utilizar una librería de fagos que comprende una pluralidad de fagos filamentosos, conteniendo el genoma de cada uno de dichos fagos una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido diferente ligada al gen de una proteína de la cubierta del fago, con lo que cada fago contiene un péptido diferente genéticamente fusionado a una
- 10           (ii)          seleccionar, mediante un ensayo de afinidad, los fagos que contienen los péptidos que se unen con mayor afinidad al TGF- $\beta$ 1; y
- (iii)          determinar la secuencia de los péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1, a partir de las secuencias de ADN correspondientes insertadas en los
- 15                       fagos seleccionados en la etapa (ii) y que codifican para dichos péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1.

En una realización particular, con el fin de obtener péptidos de 15 aminoácidos capaces de unirse con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 y con posible actividad inhibitoria de la actividad biológica de dicha citoquina, se utilizó una librería de fagos compuesta por

20 una pluralidad de bacteriófagos filamentosos (M13) conteniendo cada uno de ellos un péptido diferente, de 15 aminoácidos, genéticamente fusionado a una proteína de la cubierta del fago, en este caso unido al extremo N-terminal de la proteína de cubierta pIII. De esta forma, el fago presenta sobre su superficie un péptido de 15 aminoácidos, en cada una de las cinco moléculas de la proteína de superficie, mientras en su interior

25 contiene el ADN que codifica para dicha secuencia peptídica. En las librerías de fagos la secuencia codificante para el péptido proviene de una secuencia degenerada en cada una de las 15 posiciones con los 20 aminoácidos naturales, lo que permite la presentación de  $1,1 \times 10^{12}$  secuencias posibles de 15 aminoácidos en diferentes fagos. La relación física, 1 a 1, entre la secuencia peptídica y el ADN que lo codifica en el

30 bacteriófago permite seleccionar, de entre un gran número de variantes, aquellas secuencias que se unen específicamente al TGF- $\beta$ 1. Este proceso se realiza mediante un ensayo de afinidad.

En una realización particular, dicho ensayo de afinidad consiste en un protocolo de selección *in vitro* denominado “biopanning”. Brevemente, dicha técnica consiste en la incubación de un conjunto de fagos representantes, a efectos prácticos, de todas las variantes de péptidos de 15 aminoácidos (en este caso), en una placa bloqueada con estreptavidina a la que se le añade TGF- $\beta$ 1 biotinilado. El TGF- $\beta$ 1 biotinilado queda anclado a la placa a través de la interacción biotina-estreptavidina, con lo que queda correctamente presentado para su interacción con los péptidos portados por los fagos. Tras una incubación se eliminan los fagos no unidos mediante lavados y posteriormente se eluyen los fagos unidos específicamente, mediante un descenso de pH que rompe las interacciones moleculares entre el TGF- $\beta$ 1 y los péptidos presentados por los fagos. Los fagos eluidos son, entonces, amplificados mediante infección en una cepa bacteriana. El proceso se repite un total de 3 rondas, de manera que el contenido de fagos que se unen específicamente y con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 se va enriqueciendo. La concentración de TGF- $\beta$ 1 biotinilado utilizado para bloquear las placas se va reduciendo progresivamente en cada ronda, por ejemplo, de 2,5 a 0,01 y finalmente 0,001  $\mu\text{g/ml}$ . De este modo, los fagos seleccionados en cada ronda presentan cada vez mayor grado de afinidad por el TGF- $\beta$ 1. Al final del proceso los fagos que han sido seleccionados por su afinidad con el TGF- $\beta$ 1 son secuenciados con cebadores. Esto permite obtener las secuencias de los péptidos presentados en los fagos.

El Ejemplo 1 ilustra la selección de péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1 mediante librería de fagos, selección por “biopanning” y secuenciación de los péptidos con unión de alta afinidad al TGF- $\beta$ 1.

Debido al papel que desempeña el TGF- $\beta$ 1 en numerosos procesos biológicos, una consecuencia de la actividad inhibidora del TGF- $\beta$ 1 de los péptidos de la invención tiene que ver con el desarrollo potencial de una nueva familia de fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1, ya que tales péptidos permiten bloquear el exceso o desregulación de dicha citoquina que origina daño.

Los péptidos de la invención, por tanto, pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1, tales como (i) la fibrosis asociada con la pérdida de función de

un órgano o un tejido, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, etc., así como (ii) las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas, por ejemplo, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular, queloides, etc.

- 5 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener uno o más péptidos de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más, compuestos inhibidores  
10 del TGF- $\beta$ 1 alternativos. Dicha composición farmacéutica es útil para su administración y/o aplicación en el cuerpo humano o animal, preferentemente en el cuerpo humano.

El empleo de péptidos, tales como los péptidos de la invención, en lugar de utilizar anticuerpos u oligos antisentido, presenta numerosas ventajas, ya que son moléculas pequeñas, con mayor capacidad de difusión y de vida media más corta. Los  
15 péptidos pueden llegar a tener una elevada afinidad por el TGF- $\beta$ 1, pero se degradan más rápidamente que los anticuerpos pudiéndose controlar mediante dosificación los efectos secundarios adversos. También es más accesible la vehiculización de los péptidos a órganos o tejidos diana en comparación con otro tipo de compuestos.

Los péptidos de la invención pueden administrarse para tratar las enfermedades  
20 y las alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 por cualquier medio que produzca el contacto del péptido de la invención con el sitio de acción del mismo en el cuerpo humano o animal. La cantidad de péptido, derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo que puede estar presente en la composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede variar dentro de un  
25 amplio intervalo.

La dosificación para tratar una enfermedad o alteración patológica asociada con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 con los péptidos y/o composiciones farmacéuticas de la invención dependerá de numerosos factores, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la enfermedad o alteración patológica, la ruta y  
30 frecuencia de administración y del péptido de la invención a administrar.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos de la invención pueden presentarse en cualquier forma de administración, por ejemplo, sólida o líquida,

y pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, rectal o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada, por ejemplo, pomadas (lipogeles, hidrogeles, etc.), colirios, aerosoles por nebulización, 5 soluciones inyectables, bombas osmóticas, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

El empleo de los péptidos de la invención en la elaboración de dicha 10 composición farmacéutica constituye un aspecto adicional de esta invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1, tales como la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido, 15 por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, etc.; o las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas, por ejemplo, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular, queloides, etc.

Los péptidos de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales, por 20 ejemplo, mediante técnicas de síntesis química sobre fase sólida; purificarse mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); y, si se desea, se pueden analizar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante secuenciación y espectrometría de masas, análisis de aminoácidos, resonancia magnética nuclear, etc.

Alternativamente, los péptidos de la invención pueden obtenerse mediante la 25 tecnología del ADN recombinante. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ADN que codifica para un péptido de la invención. Dicha secuencia de ADN puede ser deducida fácilmente a partir de la secuencia del péptido.

Dicha secuencia de ADN puede estar contenida en una construcción de ADN. Por tanto, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende una 30 secuencia de ADN que codifica para un péptido de la invención. Dicha construcción de ADN puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de la secuencia de ADN que codifica para el péptido de la invención. Las secuencias de



control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción del péptido de la invención, e incluyen secuencias promotoras, terminadoras, etc., funcionales en células hospedadoras transformadas que comprenden dicha secuencia o construcción de ADN. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en bacterias. Ventajosamente, dicha construcción de ADN comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción de ADN. La construcción de ADN proporcionada por esta invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook et al., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

La secuencia de ADN o la construcción de ADN proporcionadas por esta invención, pueden ser insertadas en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia o construcción de ADN. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook et al., 1989, citado *supra*].

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora transformada, que comprende una secuencia de ADN o una construcción de ADN proporcionadas por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir un péptido de la invención que comprende crecer una célula hospedadora que comprende la secuencia o construcción de ADN proporcionada por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido de la invención y, si se desea, recuperar dicho péptido de la invención. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula hospedadora dependerán de la célula hospedadora utilizada. Si se desea, el procedimiento para producir el péptido de la invención incluye, además, el aislamiento y purificación de dicho péptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas secuencias de ADN y construcciones de ADN en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica. De acuerdo con este aspecto

5 de la invención, dichas secuencia o construcción de ADN se ponen en contacto con un vector de transferencia génica, tal como un vector viral o no viral. Vectores virales apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes, vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores alfavirales, vectores herpesvirales,

10 vectores derivados de coronavirus, etc. Vectores de tipo no viral apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: ADN desnudo, liposomas, poliaminas, dendrímeros, glicopolímeros catiónicos, complejos liposoma-policación, proteínas, sistemas de transferencia génica mediados por receptor, etc.

15 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

### EJEMPLO 1

#### Selección de péptidos que se unen al TGF- $\beta$ 1 mediante librería de fagos<sup>25</sup>

20 Para la obtención de secuencias de 15 aminoácidos capaces de unirse con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 y con posible actividad inhibitoria de la actividad biológica de esta citoquina, se utilizó una técnica de selección *in vitro* basada en la tecnología desarrollada a partir de las librerías de fagos. Estas librerías constan de bacteriófagos filamentosos (M13) que contienen un péptido genéticamente fusionado a una proteína

25 de la cubierta del virus, en este caso unido al extremo N-terminal de la proteína de cubierta pIII (Figura 1). De esta forma el fago presenta sobre su superficie un péptido de 15 aminoácidos, en cada una de las 5 moléculas de esta proteína que presenta el fago en su superficie, mientras en su interior contiene el ADN que codifica para dicha secuencia peptídica. En las librerías de fagos la secuencia codificante para el péptido proviene de

30 una secuencia degenerada en cada una de las 15 posiciones con los 20 aminoácidos naturales. Esto permite la presentación de  $1,1 \times 10^{12}$  secuencias posibles de 15 aminoácidos en diferentes fagos. La relación física, 1 a 1, entre la secuencia peptídica y

el ADN que lo codifica en el bacteriófago permite seleccionar, de entre un gran número de variantes, aquellas secuencias que se unen específicamente al TGF- $\beta$ 1. Este proceso se realiza mediante un protocolo de selección *in vitro* denominado “biopanning”.

La librería de fagos utilizada para la realización de este ejemplo procede de una  
 5 segunda amplificación de la librería primaria descrita por T. Nishi, H. Tsuru y H. Saya [Exp. Med. (Japan) 11, 1759 (1993)], cedida por el laboratorio de George P. Smith. Información adicional sobre esta tecnología puede encontrarse en la siguiente página web:

<http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>  
 10 [dex.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html)

#### Técnica de selección (Biopanning)

Esta técnica consiste en la incubación de un conjunto de fagos, representantes (a efectos prácticos) de todas las variantes de 15 aminoácidos, en una placa bloqueada con  
 15 estreptavidina (10  $\mu$ g/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, 2h a temperatura ambiente) a la que se le añade TGF- $\beta$ 1 biotinilado. El TGF- $\beta$ 1 biotinilado queda anclado a la placa a través de la interacción biotina-estreptavidina, con lo que queda correctamente presentado para su interacción con los péptidos portados por los fagos. El TGF- $\beta$ 1 se pone en contacto con los péptidos portado por los fagos a una concentración de  $3 \times 10^4$  virus/ml y se deja  
 20 incubar durante 12 horas aproximadamente. Tras la incubación, se eliminan los fagos no unidos mediante 5 lavados con PBS/Tween (tampón fosfato salino/polioxialquilen derivados de ésteres de ácidos grasos de sorbitano) y posteriormente se eluyen los fagos unidos específicamente, mediante un descenso de pH (buffer de elución) que rompe las interacciones moleculares entre el TGF- $\beta$ 1 y los péptidos presentados por los fagos. Los  
 25 fagos eluidos son, entonces, amplificados mediante infección en una cepa bacteriana (*E. coli*). El proceso se repite un total de 3 rondas, de manera que el contenido de fagos que se unen específicamente y con alta afinidad al TGF- $\beta$ 1 se va enriqueciendo (Figura 3). La concentración de TGF- $\beta$ 1 biotinilado utilizado para bloquear las placas se va reduciendo progresivamente en cada ronda de 2,5 a 0,01 y finalmente 0,001  $\mu$ g/ml. De  
 30 este modo, los fagos seleccionados en cada ronda presentan cada vez mayor grado de afinidad por el TGF- $\beta$ 1. Al final del proceso los fagos que han sido seleccionados por su afinidad con el TGF- $\beta$ 1, son secuenciados con cebadores, tras ser aislados mediante

resistencia a tetraciclina que confieren los fagos modificados genéticamente tras infectar células de *E. coli*. Esto permite obtener las secuencias de los péptidos presentados en los fagos de un número de clones obtenido de colonias aisladas. El número de veces que se repite una secuencia, correspondiente a un péptido de 15 aminoácidos portado por cada clon, del total de clones secuenciados da una idea del grado de afinidad relativa que tiene dicha secuencia de 15 aminoácidos por el TGF- $\beta$ 1.

#### Secuencia de los péptidos

Para la obtención de clones de los fagos, obtenidos a partir del "biopanning", se realiza una selección en presencia de un antibiótico de colonias bacterianas infectadas por estos fagos, cuya resistencia viene dada por un gen de resistencia a tetraciclina presente en el genoma de los fagos. Con este método únicamente crecen colonias infectadas por bacteriófagos. Así cada colonia contiene el genoma de un único fago al que le corresponde la secuencia de un solo péptido presentado en su superficie.

De las 108 colonias de bacterias infectadas por fagos, derivados de la última ronda de selección por "biopanning, se secuenció la porción del genoma que engloba la región correspondiente a los péptidos presentados en la proteína pIII utilizando el cebador identificado mediante la SEQ ID NO: 23. De este modo se obtuvieron las secuencias que se muestran en la Tabla 1 donde se indican además el número de colonias (clones) que portaban dichas secuencias.

**Tabla 1**  
**Secuencias de aminoácidos procedentes de los fagos que interactúan con el**  
**TGF- $\beta$ 1**

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Nº de colonias</b>
1	6
2	1
3	41
4	18
5	1
6	12
7	2
8	2
9	1
10	1
11	4
12	1
13	6
14	2
15	1
16	1
17	3
18	1
19	1
20	1
21	1
22	1

5

El número de clones (colonias) de cada secuencia da una idea relativa del grado de afinidad entre los péptidos y el TGF- $\beta$ 1, o sea, a mayor número de clones mayor afinidad de unión. Sin embargo, el grado de afinidad no se corresponde con la capacidad de bloquear la actividad del TGF- $\beta$ 1 puesto que el péptido más activo, el

10 péptido identificado con la SEQ ID NO: 17 (véanse las Tablas 2 y 3) da 3 clones, mientras que el péptido identificado con la SEQ ID NO: 3, que da 41 clones, es mucho menos activo en el ensayo de daño hepático agudo (Tabla 3). Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, esta cuestión podría ser explicada sobre la base de que el péptido más activo bloquearía probablemente la unión del TGF- $\beta$ 1 a su receptor.

15

### Comparación de las secuencias peptídicas

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa CLUSTAL W (1.81). Este programa genera un agrupamiento múltiple de secuencias en función de sus analogías de secuencia aminoacídica. Los péptidos quedan así agrupados por familias estructurales (Figura 4). En base a las analogías que presentan estos péptidos se pueden sugerir motivos menores de unión al TGF- $\beta$ 1 o grupos de péptidos que se unen a diferentes regiones del TGF- $\beta$ 1.

### EJEMPLO 2

#### 10 **Inhibición de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1 mediante péptidos en ensayos de proliferación con células Mv-1-Lu**

La línea celular Mv-1-Lu (CCL-64, American Type Cell Culture, Virginia, Estados Unidos) deriva de epitelio pulmonar de visón, crece en monocapa y responde al TGF- $\beta$ 1 exógeno con una disminución de su proliferación (Figura 5). La inhibición  
15 mediante péptidos de esta citoquina es capaz de restablecer su crecimiento y refleja la capacidad de los distintos péptidos como inhibidores de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1. Los péptidos ensayados fueron obtenidos mediante síntesis peptídica siguiendo procedimientos convencionales (Merrifield RB. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154; Atherton E et al. J Chem Soc Perkin Trans 1981; 1:538-546).

20 Las células Mv-1-Lu se cultivan hasta la subconfluencia en medio completo [RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, piruvato sódico, antibióticos y 10% de suero de ternera fetal (FBS)] a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en botellas de 162 cm<sup>2</sup> (Costar Corporation, CA, USA). Las células, tras tripsinizado, se cultivan en 200  $\mu$ l de medio completo en placas de 96 pocillos a una densidad inicial de 5.000 células/pocillo, a 37°C  
25 y 5% CO<sub>2</sub>, durante 6 horas para permitir su adhesión. Posteriormente se añaden los tratamientos de los diferentes péptidos a distintas concentraciones, comenzando con 200  $\mu$ g/ml y se añade TGF- $\beta$ 1 (Human Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, Roche) a una concentración de 200 pg/ml. Tras 12 horas de incubación se añade 1  $\mu$ Ci de metil-<sup>3</sup>H-timidina (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) por pocillo en 25  $\mu$ l  
30 de medio limpio (RPMI-1640) y se incuba la placa 12 horas más en las mismas condiciones. Finalmente, se cosechan las células (Filtermate 196 Harvester, Packard) transfiriéndose la timidina tritiada, incorporada en la síntesis de ADN, a placas

(UniFilter-96 GF/C®, Perkin Elmer) y la radiactividad se cuantifica, tras adición de líquido de centelleo, en un contador de centelleo (Top Count, Microplate Scintillation Counter, Packard). Como control positivo y negativo se utilizó la incorporación de timidina tritiada en ausencia y presencia de TGF-β1, respectivamente. La inhibición de la actividad del TGF-β1 en este ensayo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{100 \times (\text{cpm con péptido} - \text{cpm control negativo})}{(\text{cpm control positivo} - \text{cpm control negativo})}$$

- 10 El control negativo representa la incorporación de timidina tritiada en presencia de TGF-β1, pero en ausencia de péptido, mientras que el control positivo se refiere al mismo parámetro en ausencia de TGF-β1 y péptido. Así se puede medir el porcentaje de inhibición de los péptidos sobre la actividad biológica del TGF-β1, por su capacidad de revertir el efecto represor de esta citoquina sobre la proliferación de la línea celular Mv-1-Lu (Tabla 2).
- 15

Tabla 2

**Efecto de los péptidos obtenidos mediante la selección por “biopanning” sobre la inhibición de la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1, calculado a partir del restablecimiento del crecimiento de la línea Mv-1-Lu**

SEQ ID NO:	% Inhibición
1	3,33 $\pm$ 4,3
2	-0,96 $\pm$ 0,83
3	25,39 $\pm$ 1,7
4	5,53 $\pm$ 7,2
5	15,78 $\pm$ 7,7
6	12,85 $\pm$ 4,5
7	-24,96 $\pm$ 0,75
8	15,67 $\pm$ 8,5
9	4,98 $\pm$ 9,5
10	-4,58 $\pm$ 0,9
11	27,36 $\pm$ 0,9
12	10,70 $\pm$ 0,9
13	17,97 $\pm$ 4,3
14	3,62 $\pm$ 5,6
15	13,45 $\pm$ 9,5
16	9,47 $\pm$ 4,2
17	38,92 $\pm$ 2,3
18	21,29 $\pm$ 2,8
19	9,71 $\pm$ 3,2
20	6,16 $\pm$ 9,5
21	13,40 $\pm$ 3,2
22	4,13 $\pm$ 1,4
P144	7,26 $\pm$ 3,53

5

Los péptidos identificados como SEQ ID NO: 3, 11, 17 y 18 inhiben la actividad biológica *in vitro* del TGF- $\beta$ 1 con un porcentaje de inhibición superior al 20%.

Adicionalmente, se ha comparado la actividad del péptido identificado como P144 en la solicitud de patente española ES 2146552 A1 con la actividad del péptido  
 10 identificado mediante la SEQ ID NO: 17 en cuanto a su capacidad para revertir el efecto represor del TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación de la línea celular Mv-1-Lu previamente descrito, observándose una mejor actividad del péptido identificado como SEQ ID NO: 17.



### EJEMPLO 3

#### **Inhibición de la actividad biológica *in vivo* del TGF- $\beta$ 1 mediante péptidos en un modelo de daño hepático agudo, inducido por CCl<sub>4</sub>**

El daño hepático agudo genera una cascada de efectos y respuestas fisiológicas que incluye la elevación de los niveles de TGF- $\beta$ 1. Esta elevación es la responsable de inducir la expresión, entre otros, del gen de colágeno de tipo I. En este modelo de daño hepático agudo en ratones hembras Balb/C de 25 a 30 g de peso, se administran por vía oral 2  $\mu$ l de CCl<sub>4</sub> por gramo de ratón en relación volumétrica de 1:1 con aceite de maíz. El grupo control recibe un volumen equivalente de aceite de maíz, y los grupos tratados reciben, tras la dosis inicial de CCl<sub>4</sub>, 50  $\mu$ g de péptido en 500  $\mu$ l de suero fisiológico al 1% en DMSO (dimetilsulfóxido) cada 24 h. Tras 72 horas todos los animales son sacrificados y se realiza el procesamiento de las muestras hepáticas; para evaluar la expresión de ARNm se congeló tejido hepático en nitrógeno líquido almacenándose seguidamente a -80°C hasta su utilización. Otras muestras de tejido hepático fueron conservadas en OCT® o Tissue-Tek® (Sakura Finetek B.V.) procesándose de la misma manera que las muestras destinadas a extracción de ARNm, y también se conservaron muestras en formol tamponado al 10%, para su posterior inclusión en parafina y evaluación histológica. Posteriormente se cuantifica el nivel de ARNm de colágeno tipo I de todos los grupos mediante PCR cuantitativa. En la Figura 6 se muestra un diagrama de flujo correspondiente a la inducción, toma de muestras y cuantificación de los resultados en el ensayo de daño hepático agudo. La capacidad de los péptidos estudiados de bloquear el daño agudo, medido según los niveles de ARNm de colágeno de tipo I inducido se determinó cuantificando este ARN por PCR en tiempo real. En la Tabla 3 se muestra el grado de inhibición de la expresión de colágeno correspondiente a cada uno de los péptidos. Los péptidos ensayados fueron obtenidos mediante síntesis peptídica siguiendo procedimientos convencionales (Merrifield RB. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154; Atherton E et al. J Chem Soc Perkin Trans 1981; 1:538-546).

Tabla 3

Efecto de los péptidos obtenidos mediante la selección por “biopanning” sobre la inhibición de la actividad biológica *in vivo* del TGF- $\beta$ 1, calculado sobre la inhibición de la inducción de ARNm de colágeno tipo I en un modelo de daño hepático agudo

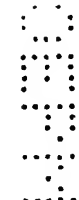
SEQ ID NO:	% Inhibición
1	0,69
2	36,6 $\pm$ 30,7
3	2,09
4	51,30 $\pm$ 15,3
5	Neg
6	74,94 $\pm$ 25,3
7	Neg
8	Neg
9	26,59
10	Neg
11	39,34 $\pm$ 21,9
12	Neg
13	32,70
14	49,84 $\pm$ 24
15	14,26
16	Neg
17	93,09 $\pm$ 9,6
18	Neg
19	12,12
20	1,41
21	Neg
22	Neg
P144	-3,51 $\pm$ 36

(Neg: negativo)

Los péptidos identificados como SEQ ID NO: 2, 4, 6, 11, 14 y 17 inhiben la actividad biológica *in vivo* del TGF- $\beta$ 1 con un porcentaje de inhibición superior al 35%.

Adicionalmente, se ha comparado la actividad del péptido identificado como P144 en la solicitud de patente española ES 2146552 A1 con la del péptido identificado mediante SEQ ID NO: 17 en cuanto a su capacidad para inhibir la expresión del ARNm del colágeno de tipo I en el ensayo de daño agudo hepático en ratones previamente definido. En este ensayo comparativo, se observa que el péptido identificado como SEQ ID NO: 17 inhibe la expresión del ARNm del colágeno de tipo I mucho más que el péptido identificado como P144 en la solicitud de patente española ES 2146552 A1 que

no tiene actividad. Los resultados obtenidos con los ensayos comparativos (Ejemplos 2 y 3) ponen de manifiesto que un péptido ilustrativo de los péptidos de esta invención (el péptido identificado mediante la SEQ ID NO: 17) es más activo que un péptido ilustrativo de la solicitud de patente española ES 2146552 A1 (el péptido identificado  
5 como P144) en los ensayos de proliferación con células Mv-1-Lu y en un modelo de daño hepático agudo.



## REIVINDICACIONES

1. Un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende entre 3 y 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

10

2. Péptido según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que posee, además, la capacidad de unirse al factor transformante del crecimiento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ).

4. Péptido según la reivindicación 3, seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

30

5. Péptido según la reivindicación 3, que posee, además, la capacidad de inhibir, *in vitro* y/o *in vivo*, la actividad biológica del TGF- $\beta 1$ .

6. Péptido según la reivindicación 5, seleccionado del grupo formado por los péptidos identificados por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, y sus sales  
5 farmacéuticamente aceptables.

7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende, al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, junto con, opcionalmente, uno o más, compuestos inhibidores del TGF- $\beta$ 1 diferentes.

15

9. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1 .

10. Empleo según la reivindicación 9, en el que dichas enfermedades o  
20 alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1 comprenden la fibrosis asociada con la pérdida de función de un órgano o un tejido, y las complicaciones quirúrgicas y/o estéticas.

11. Empleo según la reivindicación 10, en el que dichas enfermedades o  
25 alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada de TGF- $\beta$ 1 comprenden fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (cirrosis), fibrosis renal, fibrosis corneal, fibrosis asociada con la cirugía cutánea y peritoneal, fibrosis asociada con quemaduras, fibrosis osteo-articular o queloides.

30 12. Una secuencia de ADN que codifica para un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

13. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 12.

14. Construcción de ADN según la reivindicación 13 que comprende, además,  
5 operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de dicha secuencia de ADN.

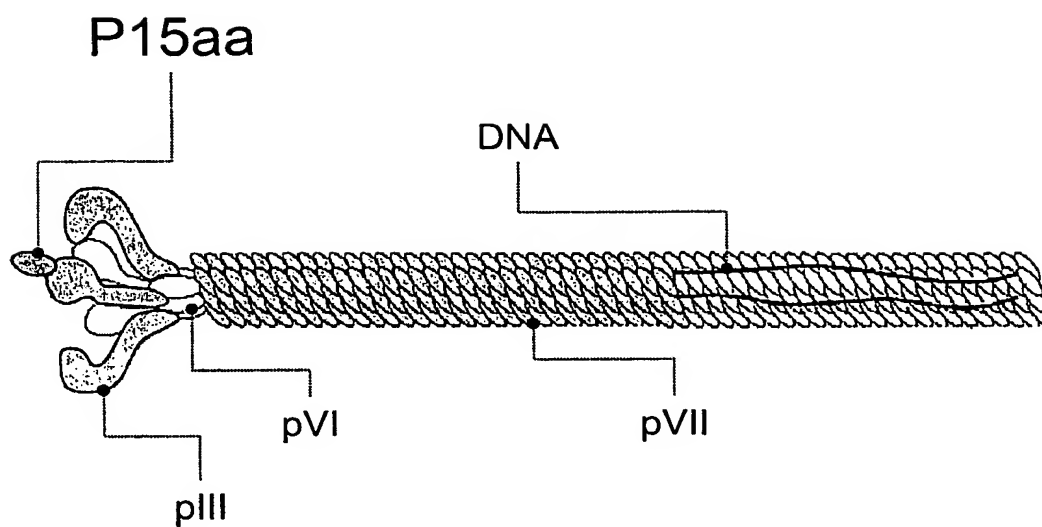
15. Un vector que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 12,  
o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14.

10

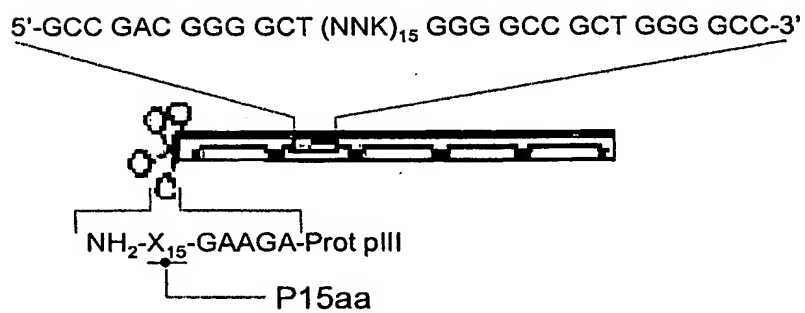
16. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 12, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, o un vector según la reivindicación 15.

15 17. Un procedimiento para producir un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende crecer una célula hospedadora según la reivindicación 16 bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido, y, si se desea, recuperar dicho péptido.

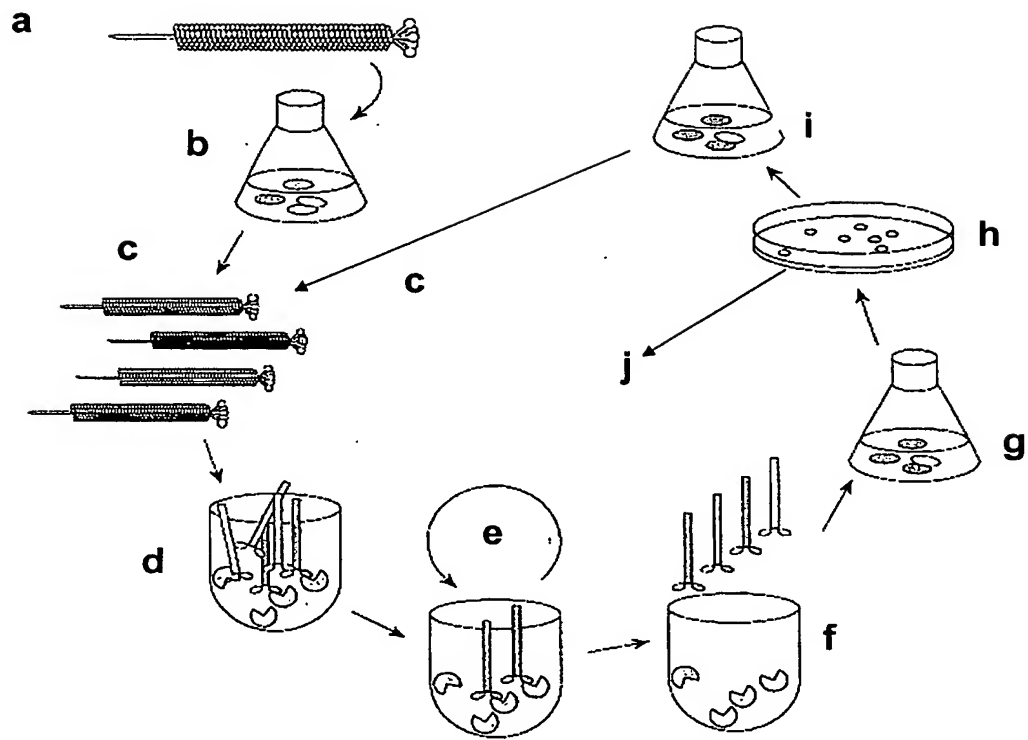
20 18. Empleo de una secuencia de ADN según la reivindicación 12, o de una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de enfermedades y alteraciones patológicas asociadas con una expresión en exceso o desregulada del TGF- $\beta$ 1 mediante terapia génica.



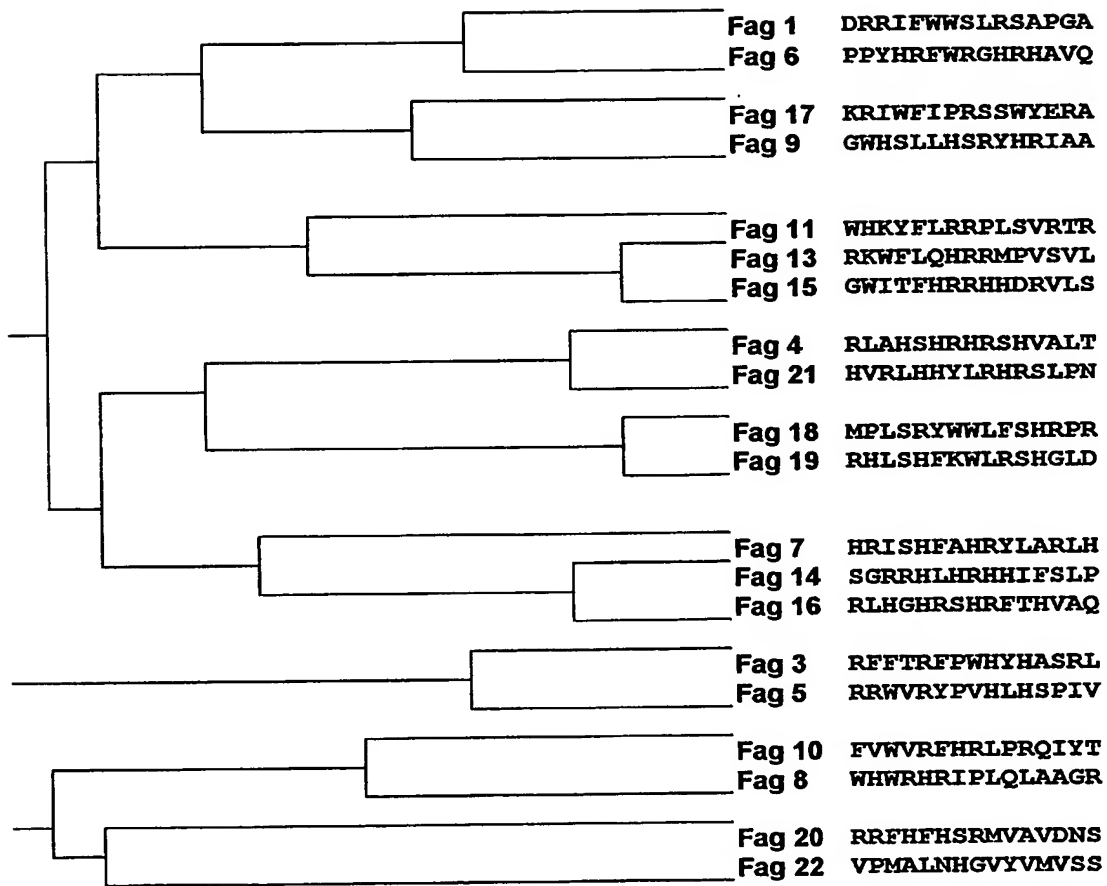
**Figura 1**



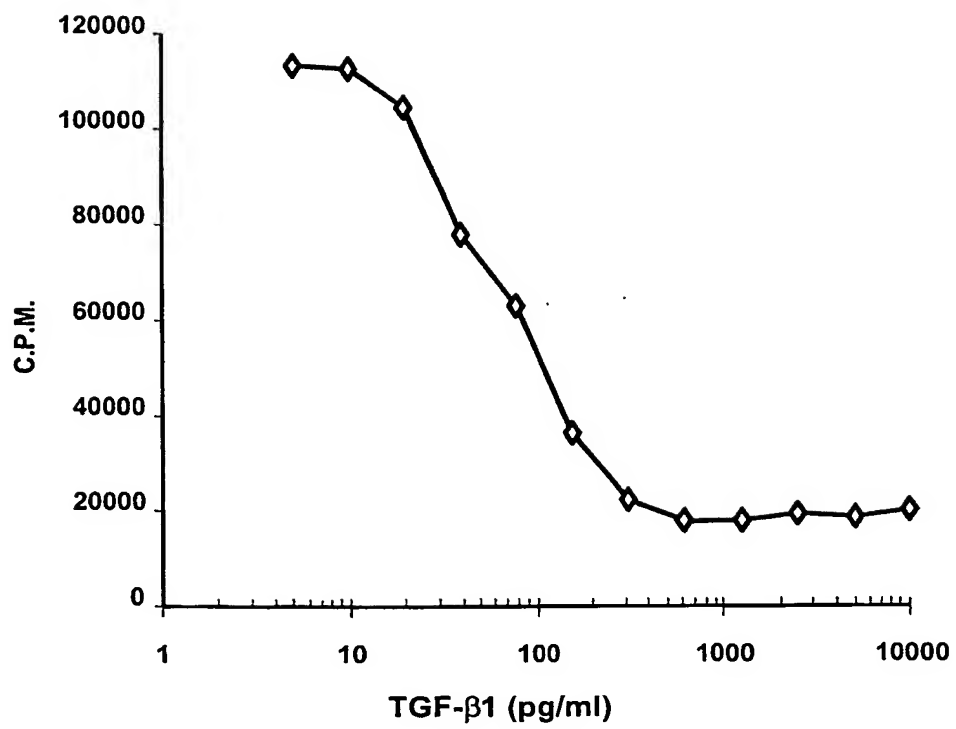
**Figura 2**

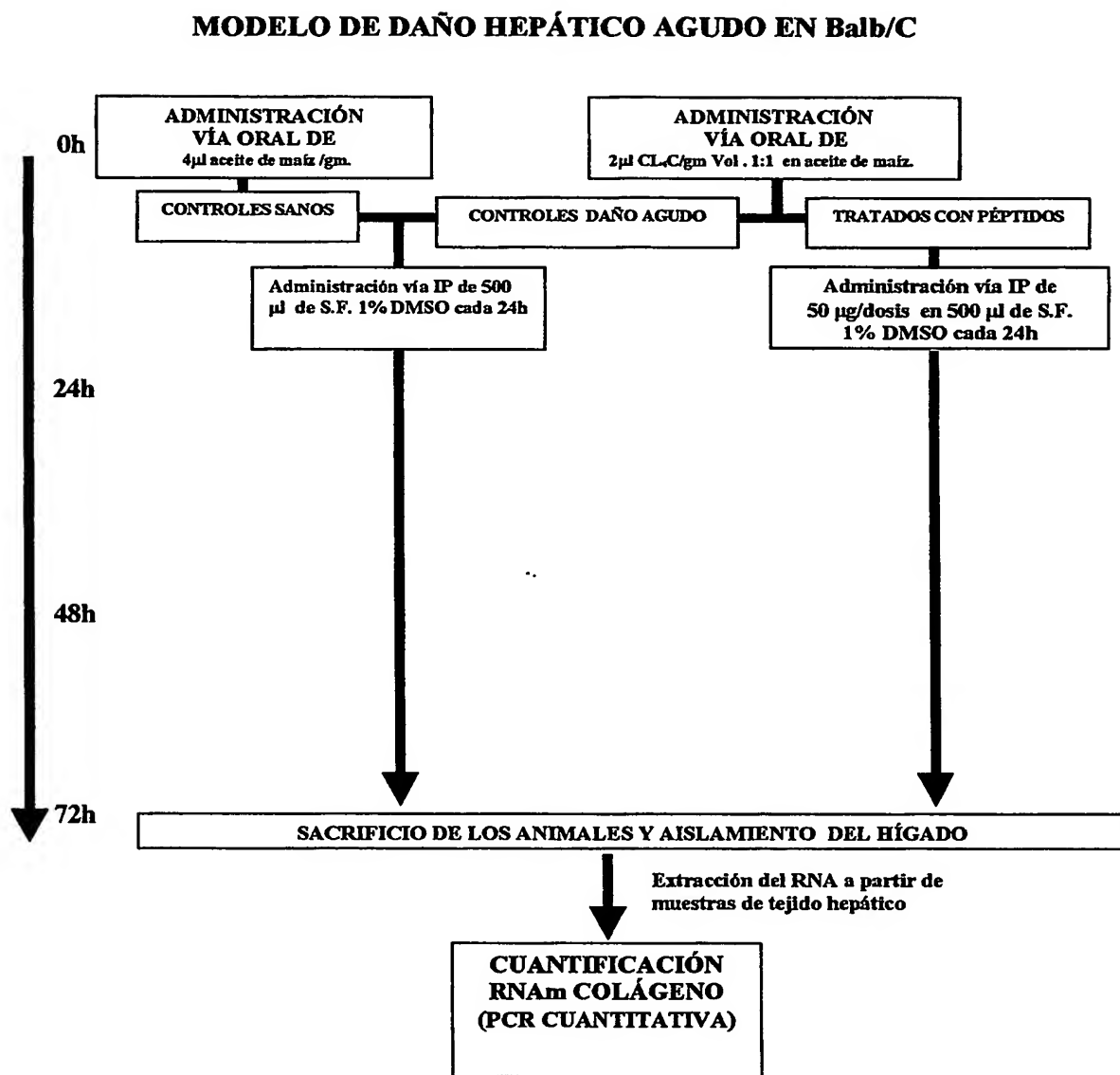
**Figura 3**





**Figura 4**

**Figura 5**

**Figura 6**

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación para la Investigación Médica Aplicada  
(FIMA)

<120> Péptidos con capacidad para unirse al factor  
transformante del crecimiento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ )

<160> 23

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 1

Asp	Arg	Arg	Ile	Phe	Trp	Trp	Ser	Leu	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 2

Asp	Arg	Arg	Ile	Phe	Trp	Trp	Ser	Asn	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 3

Arg	Phe	Phe	Thr	Arg	Phe	Pro	Trp	His	Tyr	His	Ala	Ser	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 4

Arg	Leu	Ala	His	Ser	His	Arg	His	Arg	Ser	His	Val	Ala	Leu	Thr
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 5

Arg	Arg	Trp	Val	Arg	Tyr	Pro	Val	His	Leu	His	Ser	Pro	Ile	Val
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 6

Pro	Pro	Tyr	His	Arg	Phe	Trp	Arg	Gly	His	Arg	His	Ala	Val	Gln
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 7

His	Arg	Ile	Ser	His	Phe	Ala	His	Arg	Tyr	Leu	Ala	Arg	Leu	His
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 8

Trp	His	Trp	Arg	His	Arg	Ile	Pro	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 9

Gly	Trp	His	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Arg	Tyr	His	Arg	Ile	Ala	Ala
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 10

Phe	Val	Trp	Val	Arg	Phe	His	Arg	Leu	Pro	Arg	Gln	Ile	Tyr	Thr
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 11

Trp	His	Lys	Tyr	Phe	Leu	Arg	Arg	Pro	Leu	Ser	Val	Arg	Thr	Arg
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 12

Trp	His	Lys	Tyr	Phe	Leu	Arg	Arg	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Gly
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 13

Arg	Lys	Trp	Phe	Leu	Gln	His	Arg	Arg	Met	Pro	Val	Ser	Val	Leu
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 14

Ser	Gly	Arg	Arg	His	Leu	His	Arg	His	His	Ile	Phe	Ser	Leu	Pro
1				5					10					15



<210> SEQ ID NO: 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 15

Gly	Trp	Ile	Thr	Phe	His	Arg	Arg	His	His	Asp	Arg	Val	Leu	Ser
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 16

Arg	Leu	His	Gly	His	Arg	Ser	His	Arg	Phe	Thr	His	Val	Ala	Gln
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 17

Lys	Arg	Ile	Trp	Phe	Ile	Pro	Arg	Ser	Ser	Trp	Tyr	Glu	Arg	Ala
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 18

Met	Pro	Leu	Ser	Arg	Tyr	Trp	Trp	Leu	Phe	Ser	His	Arg	Pro	Arg
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 19

Arg	His	Leu	Ser	His	Phe	Lys	Trp	Leu	Arg	Ser	His	Gly	Leu	Asp
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 20

Arg	Arg	Phe	His	Phe	His	Ser	Arg	Met	Val	Ala	Val	Asp	Asn	Ser
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 21

His	Val	Arg	Leu	His	His	Tyr	Leu	Arg	His	Arg	Ser	Leu	Pro	Asn
1				5					10					15

<210> SEQ ID NO: 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Péptido secuencia artificial

<400> 22

Val	Pro	Met	Ala	Leu	Asn	His	Gly	Val	Tyr	Val	Met	Val	Ser	Ser
1				5				10						15

<210> SEQ ID NO: 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador fdtet15-mer

<400> 23

TGAATTTTCT GTATGAGG